

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 601 034

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 86 09662

(51) Int Cl⁴ : C 12 N 15/00; A 61 K 37/64; C 07 H 21/04;
C 07 K 13/00; C 12 P 19/34, 21/02.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 3 juillet 1986.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 1 du 8 janvier 1988.

(60) Références à d'autres documents nationaux appartenus :

(71) Demandeur(s) : Fondation reconnue d'utilité publique : INSTITUT PASTEUR et Etablissement public dit : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE - INSERM. — FR.

(72) Inventeur(s) : Mario Tosi, Christiane Duponchel et Tommaso Meo.

(73) Titulaire(s) :

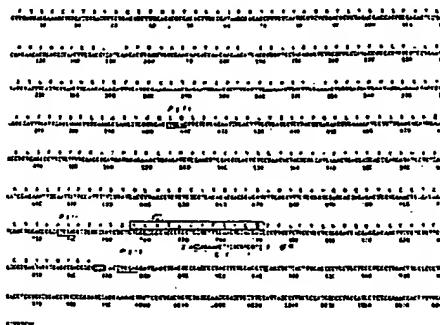
(74) Mandataire(s) : Cabinet Ores.

(54) Inhibiteur de l'activité de la C1-estérase plasmatique (C1-inhibiteur) et d'autres enzymes protéolytiques du groupe des protéases à serine, son procédé de préparation, acides nucléiques codant pour cet inhibiteur, méthodes de détection d'affections corrélées aux défauts dudit inhibiteur à l'aide d'anticorps ou de sondes nucléotidiques et médicaments contenant ledit inhibiteur de synthèse.

(57) Inhibiteur C1-INH, ou fragments de celui-ci, préparé en utilisant un procédé de construction de clones bactériens ou recombinants, ou de cellules eucaryotes recombinantes contenant un ADNc codant pour le C1-INH humain.

Procédé de construction desdits clones ou cellules.

Application notamment à la détection et au traitement d'affections corrélées aux défauts dudit inhibiteur et en particulier de l'angioédème héréditaire.



- 1 -

La présente invention est relative à un inhibiteur de l'activité de la C1-estérase plasmatique et d'autres enzymes protéolytiques du groupe des protéases à sérine, à son procédé de préparation, à des acides nucléiques codant pour 5 cet inhibiteur, à des méthodes de détection d'affections, corrélées aux défauts dudit inhibiteur, à l'aide d'anticorps ou de sondes nucléotidiques et à des médicaments contenant ledit inhibiteur de synthèse.

Les différentes classes des inhibiteurs de protéases représentent une fraction importante des protéines du plasma et ils jouent des rôles déterminants dans le contrôle spécifique des différents processus protéolytiques. Les mieux étudiés de ces inhibiteurs sont les inhibiteurs des séries-protéases tels que l'inhibiteur d' α_1 -protéase (α_1 -PI ou α_1 -antitrypsine). Des comparaisons des séquences protéiques ont conduit à la constatation que l'ovalbumine et l'angiotensinogène présentent, de même que d'autres inhibiteurs de séries-protéases que le α_1 -PI, des similitudes des structures primaires avec ce dernier, et que toutes ces protéines 15 appartiennent à une même famille fonctionnellement diversifiée, à laquelle a été attribué le nom de famille des Serpines (Serine Proteinase Inhibitors) par CARRELL et TRAVIS (TIBS, 10, (1985) 20-24).

Comme on le sait, le C1-inhibiteur ou C1-INH est 25 une glycoprotéine à chaîne unique dont le PM est d'environ 100000 et qui contient 35% d'hydrates de carbone. Le C1-INH a été identifié à l'origine comme étant un inhibiteur de la forme activée du premier composant du complément sérique C1, à savoir le complexe (C_{1q} + (C_{1r})₂ + (C_{1s})₂). Il est le seul 30 inhibiteur plasmatique connu du C_{1r} et du C_{1s}, qui sont les sous-composants enzymatiques du C1. Ce C1-INH inhibe également la kallicréine du plasma, les facteurs XIIa et XIIa et la plasmine. De plus, le C1-INH réagit avec les formes non activées du C_{1r} et du C_{1s}, empêchant ainsi l'activation spontanée du C1.

- 2 -

Certains Auteurs ont cherché à déterminer au moins en partie la séquence du site réactif du C1-INH humain. Cependant les informations fragmentaires dont on dispose jusqu'à présent sur la séquence en question, ne font apparaître 5 qu'une communauté structurale entre le C1-INH et les serpines typiques (α -PI, α -Achy, AT III, ovalbumine, angiotensinogène) limitée à l'emplacement du site réactif dans la partie carboxyterminale de la molécule (cf. SALVESEN et Al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 260, N° 4, 25 Février 10 1985, p. 2432-2436); de plus, les 40 résidus aminoterminalux du C1-INH humain décrits par HARRISON (BIOCHEMISTRY, 22, 1983, p. 5001-5007) ne présentent pas d'homologie séquentielle significative avec les serpines connues.

Or, il est d'une importance déterminante de pouvoir 15 identifier la séquence du C1-INH et ses liens avec les autres - ou d'autres - serpines : en effet, comme on le sait, des taux insuffisants de C1-INH fonctionnel dans le serum humain sont à l'origine d'une affection héréditaire grave, transmise comme caractère autosomal dominant, l'angioedème héréditaire 20 (HAE). Cette affection se traduit par des crises paroxystiques d'oedème localisé qui sont particulièrement graves lorsqu'elles affectent les muqueuses gastro-intestinales et les muqueuses des voies respiratoires aériennes supérieures. Les crises qui atteignent le larynx comportent un taux de mortalité élevée par asphyxie.

On a introduit avec succès des traitements prophylactiques de l'HAE à l'aide d'agents hormonoaux (androgènes à faible pouvoir virilisant) et d'agents antifibrinolytiques (acide tranexamique). Cependant les traitements hormonoaux 30 sont mal tolérés par les femmes et contre-indiqués chez les femmes enceintes et les enfants en cours de croissance, etc De plus, les agents androgéniques et les agents antifibrinolytiques sont peu efficaces lorsque la crise a déjà commencé.

Il a donc été proposé de remplacer les traitements

- 3 -

hormonaux et antifibrinolytiques par un traitement constitué par une préparation de C1-INH partiellement purifiée obtenue à partir de plasma humain (cf. GADEK et Al. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Vol. 302, N° 10, 6 Mars 1980,
5 p. 542-546). Or si les préparations de C1-INH constituent le traitement de choix de ce type d'affection, les quantités de C1-INH d'origine plasmatique humaine susceptibles d'être collectées sont nécessairement limitées et, surtout, leur fiabilité dépend de la qualité du contrôle visant à exclure toute
10 contamination virale.

Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'autres sources de C1-INH à la fois pour permettre une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles du C1-INH et pour disposer d'une source d'agent thérapeutique constante et sans
15 aléas.

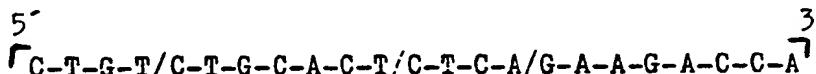
C'est pour atteindre les buts ainsi définis que les Inventeurs se sont tournés, pour acquérir une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles de la protéine qui constitue le C1-INH et pour développer une source alternative
20 de C1-INH en tant qu'agent prophylactique et thérapeutique du HAE, vers la production des peptides du C1-INH par génie génétique. Une autre application commerciale d'une source alternative de C1-inhibiteur serait dans le domaine du dosage immunochimique de cette protéine dans le sérum humain. Ce dosage fait partie de la routine du diagnostic de l'angioédème soit héréditaire, soit acquis. Le C1-inhibiteur préparé à plus grande échelle et sans contamination possible due à
25 d'autres protéines plasmatiques pourrait être utilisé dans le dosage immunochimique par compétition et d'autre part faciliterait la production d'anticorps spécifiques à utiliser dans le dosage direct.

La présente invention a pour objet le C1-inhibiteur ou des fragments de celui-ci préparés en utilisant un procédé de construction de clones bactériens recombinants ou de celles eucaryotes recombinantes contenant un ADN complémentaire

- 4 -

taire "ADNc"codant pour le C1-INH humain. Conformément à l'invention, ledit procédé de construction de clones est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - une première étape qui consiste à extraire l'ARN total de fragments de foie humain prélevé post-mortem; - une deuxième étape qui consiste à isoler l'ARN polyadénylé, par chromatographie sur du Poly(U)-Sephadex, suivie d'élution à 42°C par du formamide à 50%; - une troisième étape qui consiste à dénaturer l'ARN polyadénylé, par de l'hydroxyde de méthylmercure et à le fractionner par séparation par un gradient isocinétique de saccharose de 10 à 33% poids/volume; - une quatrième étape qui consiste à identifier les fractions d'ARN qui sont enrichies en messagers codant pour le C1-INH; - une cinquième étape qui consiste à synthétiser de l'ADNc double-brin à partir d'une fraction d'ARN enrichie en ARN messagers codant pour le C1-INH, en rendant une extrémité de l'ADNc homopolymère et en l'intégrant dans le vecteur pUC9 à extrémité poly(dG), puis en introduisant les plasmides recombinants formés, dans des bactéries E. coli compétentes; - une sixième étape qui consiste à critier les bactéries qui possèdent l'information génétique nécessaire à la production du C1-INH et à isoler les clones d'ADNc qui codent pour le C1-INH humain.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de préparation de clones d'ADNc codant pour le C1-INH, le criblage des clones recombinants a été réalisé à l'aide d'un mélange marqué de huit icosamères synthétiques couvrant les acides aminés LVFEVQQ, qui sont une partie du peptide séquencé et positionné par SALVESEN et Al. (Loc. cité) au site réactif, à proximité de l'extrémité carboxyle de la protéine, lesquels icosamères synthétiques sont constitués par des oligonucléotides de formule A ci-après :



- 5 -

qui constitue une sonde moléculaire synthétique pour le C1-INH humain et d'autres mammifères.

La présente invention a, en outre, pour objet la séquence en nucléotides codant pour tout ou partie du C1-inhibiteur, les ADN recombinants et les clones contenant lesdits ADN, obtenus par le procédé mis en oeuvre. Les clones codent pour au moins une partie de l'inhibiteur C1-INH humain ou d'une protéine très voisine de ce dernier par sa structure primaire ou son activité biologique.

L'invention couvre également tant la séquence nucléotidique et en acides aminés complète du C1-inhibiteur que les fragments de celui-ci caractérisés par les séquences porteuses de l'activité biologique de ce dernier. L'invention couvre, de même, les variants nucléotidiques du gène codant pour le C1-inhibiteur, permettant la synthèse d'un produit d'activité similaire au C1-inhibiteur.

Conformément à l'invention, les clones sont constitués par un plasmide dénommé pHC1-INH/1, déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur en date du 25 Juin 1986 sous le N° I-573. Ce plasmide contient la séquence représentée à la Figure 1 annexée.

L'invention couvre également les constructions obtenues en mettant en oeuvre un plasmide d'expression ou des phages de type λ gt11 dans le cas où l'hôte est un prokaryote, par exemple *E. coli*. Dans le cas où l'hôte est une cellule eucaryote animale (cellules Vero par exemple) ou une levure, permettant les modifications post-traductuelles correspondantes à la protéine naturelle (glycosylation par exemple), on peut utiliser des vecteurs viraux tels que le HSV (herpes), le virus de vaccine, le BPV (bovine papillomavirus) ou l'HFV (human papillomavirus), contenant la séquence nucléotidique codant pour le C1-inhibiteur ou un fragment de celui-ci. Toutes les techniques permettant de transférer les ADN recombinants codant pour tout ou partie

du C1-inhibiteur constitué par un plasmide selon l'invention, à un autre système d'expression (phages, virus, etc..) sont connues de l'homme de l'Art.

Selon un mode de réalisation préféré des clones conformes à l'invention, ceux-ci sont caractérisés en ce qu'ils présentent une séquence de nucléotides de leur ADNc inséré qui code pour la phase de lecture ouverte (ORF = open reading frame) de 288 codons qui répond à la formule représentée à la Figure 2 annexée.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le C1-INH présente une séquence d'amino-acides définie à la Figure 3 annexée, laquelle séquence est déduite du plasmide pHCI-INH/1.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, on procède comme suit :

(a) Préparation d'ARN de foie

Des fragments de foie humain prélevé post-mortem sont ajoutés à de l'azote liquide dans un mélangeur et sont réduits en poudre fine. L'ARN est extrait par la technique d'AUFFRAY et ROUGEON (EUR. J. BIOCHEM. 107 (1980) p. 303-324) au chlorure de lithium/urée. L'ARN polyadénylé est isolé par chromatographie sur Poly(U)-Sephadex, l'élution étant réalisée à 42°C avec du formamide à 50%. L'ARN polyadénylé obtenu est dénaturé par de l'hydroxyde de méthylmercure (10 mM) et fractionné par séédimentation sur un gradient isocinétique de 10-33% poiss/volume de saccharose.

30 (b) Traduction en milieu accellulaire et immunosélection.

Du lysat de réticulocytes de lapin a été préparé et mis en oeuvre conformément à la technique de PELHAM et JACKSON (EUR. J. BIOCHEM. 67 (1976) p. 247-256) modifiée par TOSI et Al. (IMMUNOL. REVIEWS. 78, (1985) p. 151-183). Les immunosélections ont été réalisées conformément à la méthode de SALERNO et Al. (PROC. NAIL. ACAD. SCI. USA, 81, (1984) p. 110-114) avec des anticorps anti-C1r ou anti-C1s fixés à du Protéine A-Sépharose.

(c) Construction d'une banque d'ADNc de foie humain.

De l'ADN double-brin a été synthétisé à partir d'ARN fractionné sur un gradient de saccharose, en utilisant la méthode de GUBLER et HOFFMAN (GENE, 25 (1983) p. 263-269). On homopolymérisé une extrémité de l'ADNc et on insère celui-ci dans le vecteur PUC9 décrit par VIEIRA et MESSING (GENE 19 (1982) p. 259-268) à extrémité en poly(dG), en utilisant les méthodes désormais classiques décrites par MANIATIS et Al. dans leur manuel de laboratoire intitulé "Molecular Cloning" paru en 1982 aux Ed. COLD SPRING HARBOR LABORATORY. Des bactéries E. coli 5K (HUBACEK et GLOVER, J. MOL. BIOL., 50, (1979), p. 111-127) ou la souche E. coli HB101 (BOLIVAR et BACKMAN, METHODS ENZYMOL. 68, (1979), p. 245), rendues compétentes (HANAHAN, D. , J. MOL. BIOL., 166 (1983), p. 557-580) sont utilisées pour la réalisation de la banque d'ADNc qui comprend 50000 transformants indépendants et qui est amplifiée environ 500 fois. Après une étape d'amplification, la banque d'ADNc est conservée sous forme d'échantillons congelés en présence de 15 % de glycérol.

L'ADNc double-brin a été synthétisé, comme indiqué plus haut, par la méthode de GUBLER et Al. et inséré dans le site PstI du vecteur pUC9 comportant une extrémité poly dG.

25 (d) Criblage à l'aide d'une sonde moléculaire

Des aliquots appropriés de la banque d'ADNc amplifiée, représentant au total environ 20000 colonies (éventuellement conservés jusqu'à l'emploi, par congélation rapide dans un bouillon L contenant 15% de glycérol) ont été zis sur gélose à raison de 5000-10000 bactéries ampicilline-résistantes par plaque (NUNC, de 22 x 22 cm) et transférés sur des filtres de Nylon (de marque PALL-BIODYNE) traités comme décrit dans MANIATIS et Al. (Loc. cité).

Le criblage des clones de C1-INH a été réalisé à l'aide d'un mélange de huit icosamères synthétisés par la technique de la phosphoramidite, à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (fourni par APPLIED BIOSYSTEMS, référence 380A) et portant un marquage terminal par la ($-^{32}\text{P}$)ATP et la T4-polynucléotide-kinase (MANIATIS et Al. Loc. cité). Ce mélange marqué couvre les amino-acides LVFEVQQ, qui sont une fraction du peptide séquencé et positionné par SALVESEN et Al. (Loc. cité) au site réactif, à proximité de l'extrémité carboxyle de la protéine. Les oligonucléotides qui le composent ont été isolés dans toute leur longueur, après marquage, à partir d'un gel acrylamide 20%/urée 8M, puis purifiés sur du SEPHADEX G10 (fourni par PHARMACIA).

Le choix pour cette sonde oligonucléotidique, d'une 15 séquence

$5' \text{C-T-G-T/C-T-G-C-A-L-T/C-T-C-A/G-A-A-G-A-C-C-A} 3'$

a été déterminé par la prise en considération de toutes les possibilités de codons pour les trois amino-acides internes (F, E et Q) avec une dégénérescence de deux codons.

Les filtres utilisés pour le criblage ont été pré-hybridés dans un tampon comprenant 90 mM de Tris-EDTA (pH 7,5), 6 mM d'EDTA, 0,9 M de NaCl, 0,1% de Na DodeSO₄, 400 µg /ml d'ARN de levure, 5x de solution de Denhardt (0,1% Ficoll, 0,1% polyvinylpyrrolidone, 0,1% BSA) et 100 µg/ml d'ADN d'E. coli fragmenté et dénaturé. L'hybridation des filtres a été réalisée à 37°C pendant 8 heures dans un tampon analogue, cependant dépourvu de solution de Denhardt et d'ADN d'E. coli, puis la sonde d'oligonucléotide a été ajoutée à une concentration de 0,2 picomoles/ml ($4 \times 10^5 \text{ cpm/ml}$). Les filtres ont été soigneusement lavés à 37°C dans du tampon contenant 0,9M NaCl, 90 mM citrate de sodium, 0,1% Na DodeSO₄.

Après deux séries de criblages, douze colonies positives ont été isolées et leur ADN de plasmide a été analysé par coupure par les endonucléases de restriction PstI ou Pvull.

5 Les hybridations effectuées avec la sonde moléculaire synthétique conforme à l'invention ont permis d'identifier dans les clones de C1-INH un petit fragment obtenu par digestion avec PstI d'environ 140 bp qui contient des séquences complémentaires de ladite sonde synthétique.

10 (e) Analyse de la séquence

On a dressé la carte des sites d'endonucléase de restriction de l'insertion du clone CNCM N° I-573 mentionné précédemment pHc1-INH/1, par marquage terminal et digestions partielles conformément à la méthode de SMITH et BIRNSIEL 15 (Nucleic Acids Res., 3, (1976) p. 2387-2396) comme cela est montré à la Figure 4 annexée. Les deux brins de chaque fragment PstI ont été sous-clonés dans le vecteur M13/mp δ (décris par KESSING et VIEIRA, Loc. cité) et séquencés à l'aide de la "méthode au dideoxy" de SANGER et Al. (Proc. Natl. Acad. 20 Sci. USA, 74 (1977) p. 5463-5467). La séquence a été vérifiée par sous-clonage et séquençage des fragments figurant en hachuré dans la Figure 4.

La séquence d'amino-acides déduite du plasmide pHc1-INH/1 confirme la présence de 5 résidus VARTL (Valine, 25 Alanine, Arginine, Threonine, Leucine) restants du peptide séquencé par SALVESEN et Al. (Loc. cité) et non couverts par la sonde synthétique de formule A. À titre d'exemple, on peut se reporter à la Figure 1.

La séquence d'amino-acides autour du site réactif 30 est hautement spécifique de chaque inhibiteur de sérine-protéase; c'est pourquoi la parfaite concordance de la séquence d'amino-acides obtenue confirme que le plasmide pHc1-INH/1 code pour une partie de l'inhibiteur de C1 humain ou pour une partie d'une protéine étroitement apparentée à 35 cet inhibiteur par sa structure primaire.

(f) Sélection de l'ARNm par hybridation avec de l'ADN de plasmide immobilisé

La preuve que le clone pHCI-INH/1 non seulement correspond bien à une protéine apparentée à C1-INH mais qu'il s'agit effectivement de celle identifiée par l'antisérum, a été obtenue par l'isolement des ARNm messagers correspondants à la séquence portée par le plasmide pHCI-INH/1. De l'ADN de plasmide dénaturé linéarisé (10 µg) fixé sur de la poudre de cellulose a été agité à 50°C pendant 15 heures en présence de 400 µg d'ARN de foie total dissous dans 200 µl d'une solution de formamide à 50% contenant de l'Hepes de sodium (50 mM, pH 7,5), du NaCl (400 mM), de l'EDTA (1 mM) et 0,2% de DodSO₄ de sodium. La poudre de cellulose a été lavée à 5 reprises à 40°C par 2 ml de la solution ci-dessus sans formamide et tenant 50 mM de NaCl, et à 5 reprises à 65°C dans cette dernière solution dans laquelle l'Hepes de sodium avait été abaissé à 10 mM et le NaCl augmenté à 150 mM. Après deux lavages supplémentaires dans cette solution sans DodSO₄ de Na, l'ARN a été élué par incubation de la poudre de cellulose trois fois dans 100 µl d'eau stérile contenant de l'ARNt de foie de veau (7 µg) et de l'hydroxyde de méthylmercure (10 mM). L'ARN a été traité par du 2-mercaptopropanoïde (30 mM) avant de le précipiter par de l'éthanol.

La Figure 5 annexée représente la traduction in vitro d'ARNm sélectionné par hybridation sur le plasmide pHCI-INH/1, obtenue par hybridation d'ARN de foie total (400 µg) à 10 µg d'ADN de plasmide recombinant dénaturé fixé par covalence à de la poudre de cellulose : l'ARN élué est traduit dans un système acellulaire, comme indiqué plus haut. Le fluorogramme, représenté à la Figure 5, à un gel de PA-SDS à 12,5% représente les polypeptides produits en l'absence d'ARN exogène (colonne 1) et ceux synthétisés par l'ARNm sélectionné à l'aide du plasmide pHCI-INH/1 (colonnes 4 et 5). Alors qu'un quart des produits de traduction de l'ARNm hybride sélectionné est chargé directement sur la colonne 4, les produits restants de cette traduction sont

immunosélectionnés par des anticorps anti-C1-INH (colonne 5). La colonne 3 représente une immunosélection témoin des produits de traduction de l'ARN total, par les mêmes anticorps anti-C1-INH. Comme le montre la Figure 5, les messagers qui s'hybrident au plasmide pHC1-INH/1 dirigent la synthèse de polypeptides qui migrent conjointement avec la protéine précurseur du C1-INH précédemment identifiée, représentée à la colonne 4, et sont reconnus par des anticorps anti-C1-INH (colonne 5). Le plasmide pHC1-INH/1 identifie donc dans le foie humain une seule espèce majeure d'ARN qui est traduite in vitro en polypeptides de taille homogène, qui présentent une réaction antigénique avec un antisérum C1-INH-spécifique.

(g) Examen des homologies de séquence du C1-INH et de membres de la famille des serpines

Une comparaison de la séquence du C1-INH déduite du clone pHC1-INH/1 conforme à l'invention avec les séquences de l' α_1 -antitrypsine (α_1 -PI) et de l'antithrombine III humaine (AT-III), fait apparaître une identité de 27% des acides aminés entre le C1-INH et l' α_1 -PI et une identité un peu moindre entre le C1-INH et l'AT-III (23%).

La constatation d'une parenté de structure entre le C1-INH et l' α_1 -PI permet d'utiliser la structure tridimensionnelle connue de la forme clivée de cette dernière protéine comme modèle de première approximation pour le C1-INH. De même, les informations relatives à la pathologie moléculaire des déficiences d' α_1 -PI qui sont données par la littérature, fournissent également un modèle pour l'étude des formes dysfonctionnelles du C1-INH.

En outre, les sondes moléculaires pour le C1-INH humain sont susceptibles de contribuer dans une mesure importante à la compréhension au niveau moléculaire, des différentes formes d'HAE qui résultent des taux insuffisants de C1-INH dans le sérum, et à l'étude de la régulation du gène normal.

Enfin, les peptides de C1-INH produits par génie génétique devraient permettre le développement de médicaments pour le traitement préventif et le traitement de crise des HAE. A titre indicatif, on peut utiliser la séquence suivante :

SIMEKLEFFDFSYDLNLGGLTEDPDLQVSAMQHQTVLELTET
GVEAAAASAISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFKGRVYLPR

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en oeuvre, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 - PREPARATION D'ADN RECOMBINANT CODANT POUR LE C1-INH HUMAIN

1^{ere} Etape : Préparation d'ARN de foie

20 Des fragments de foie humain prélevé post-mortem ont été ajoutés à de l'azote liquide dans un mélangeur et ont été réduits en poudre fine. L'ARN a été extrait par la méthode en chlorure de lithium/urée (AUFRAY et ROUGEON, 1980). L'ARN polyadénylé a été isolé par chromatographie

25 sur du Poly(U)-Sephadex, conformément aux instructions du Fournisseur (BETHESDA RESEARCH LABORATORY) sauf que l'élution a été effectuée à 42°C avec du formamide à 50%.

30 L'ARN polyadénylé a été dénaturé par 10 mM d'hydroxyde de méthylmercure et fractionné par sédimentation sur un gradient isocinétique de saccharose à 10-33% poids/volume.

2ème Etape : Construction d'une banque d'ADNc de foie humain enrichi

De l'ADNc double-brin a été synthétisé à partir de 8 microgrammes d'ARN fractionné par le gradient de saccharose, conformément à la méthode de GUELER et HOFFMAN (1983). Des procédures standards ont été mises en oeuvre (MANIATIS et Al. 1982) pour obtenir de l'ADNc à extrémités homopolymères et l'insérer dans le vecteur pJC9 à extrémité Poly(dG) (VIEIRA et MESSING, 1982). Des bactéries *E. coli* 5K compétentes ont été préparées conformément à HANAHAN (1983) pour réaliser un banque d'ADNc. On peut également utiliser la souche *E. coli* HB101 (Référence : Methods Enzymol., 1979, 68 Bolivaretal).

La banque d'ADNc, qui comprend 50000 transformants indépendants a été amplifiée environ 500 fois et des aliquots sont rapidement congelés dans du bouillon contenant 15% de glycérol. En vue du criblage, 5000 à 10000 bactéries ampicilline résistantes ont été placées sur des plaques NUNC (de 22 cm x 22 cm). Les colonies ont été transférées sur des filtres de Nylon "Pall-Biodyne" préalablement traités comme décrit par MANIATIS et Al.

3ème Etape : Criblage par des oligonucléotides synthétiques

Un mélange radiomarqué de 8 icosaïères couvrant les amino-acides LVFEVQQ a été synthétisé par la technique de la phosphoamidite, à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (APPLIED BIOSYSTEMS 380 A); après marquage terminal par la (-³²P)ATP et la T4-polynucléotide-kinase, les oligonucléotides ont été isolés à partir d'un gel d'acrylamide 20%/urée 8M. Le criblage a été réalisé avec des filtres préhybridés dans un tampon contenant 90 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM d'EDTA, 0,9 M de NaCl, 0,1% de

- 14 -

Na DdSSO₄, 400 µg/ml d'ARN de levure, de la solution de Denhardt et 100 µg/ml d'ADN d'E. coli fragmenté et dénatré, puis hybridés pendant 8 heures à 37°C dans le même tampon sans solution de Denhardt ni ADN d'E. coli, avec addition de la sonde oligonucléotidique à une concentration de 0,2 picomoles/ml (4×10^5 cpm/ml), après quoi les filtres ont été lavés à fond à 37°C dans du tampon contenant 0,9 M de NaCl, 90 mM de citrate de Na, 0,1% de Na DdSSO₄.

Après deux séries de criblages, douze colonies positives ont été isolées et leur ADN de plasmide analysé par coupe par les endonucléases de restriction PstI ou PvUII. Les hybridations avec le même mélange d'oligonucléotides que ci-dessus ont démontré que dix des douze clones probables de C1-INH ont le même petit fragment obtenu par digestion par PstI, de l'ordre de 140 bp, qui contient les séquences complémentaires à la sonde oligonucléotidique conforme à l'invention. Seul le clone pHC1-INH/1, qui contient l'insertion la plus longue, a été ensuite analysé pour dresser la carte de ses sites de restriction et pour déterminer sa séquence en nucléotides.

4ème Etape : Sélection de l'ARNm par hybridation par de l'ADN de plasmide immobilisé

10 µg d'ADN de plasmide dénaturé linéarisé fixé à de la poudre de cellulose ont été agités à 50°C pendant 15 heures en présence de 400 µg d'ARN total de foie dissous dans 200 µl d'une solution de formamide à 50% contenant 50 mM de tampon Hepes de Na, pH 7,5, 400 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA et 0,2% de Na DdSSO₄. La poudre de cellulose a été lavée 5 fois à 40°C, par 2 ml de la même solution toutefois dépourvue de formamide et contenant 50 mM de NaCl, et 5 fois à 65°C dans cette dernière solution ne contenant plus que 10 mM d'Hepes de Na et dans laquelle le NaCl avait été porté à 180 mM. Après

deux lavages finaux dans cette solution dépourvue de Na DodSO₄, l'ARN a été élué par incubation de la poudre de cellulose 3 fois dans 100 µl d'eau stérile contenant 7 µg d'ARNT de foie de veau et 10 mM d'hydroxyde de méthylmercure. L'ARN a été traité par 30 mM de 2-mercaptopéthanol préalablement à sa précipitation par de l'éthanol.

5 EXEMPLE 2 - SYNTHÈSE D'UN POLYPEPTIDE D'ACTIVITE SIMILAIRE AU C1-INH

10 L'ADN recombinant constitué par le plasmide pHc1-INH/1 selon l'invention permet la production dans E. coli de polypeptides correspondant à une partie du C1-INH et contenant le site réactif. Pour mettre en œuvre la production de ces polypeptides, on procède aux étapes suivantes.

15 1ère Etape - Transfert de l'insertion du plasmide pHc1-INH/1
ou d'une partie de cette insertion dans un
vecteur spécialement conçu pour une production
optimale de la protéine C1-INH.

20 Plusieurs vecteurs de ce type sont disponibles et leur mode d'utilisation est connu. À titre d'exemple, on peut utiliser des vecteurs qui portent un promoteur fort dérivé du bactériophage Lambda (ZETTLMEISSL et Al., Gene 41, (1986) p. 103 ; CROWL et Al., Gene 38, (1985) p. 31).

25 2ème Etape - Dosage quantitatif et qualificatif des peptides C1-INH produits par génie génétique.

30 Ce dosage se fait par exemple par marquage de cultures bactériennes, contenant les plasmides recombinants, en utilisant des acides aminés radioactifs. Les polypeptides C1-INH sont mis en évidence par immunoprécipitation avec des anticorps anti-C1 inhibiteur, suivie par PA-SDS gel électrophorèse. Des méthodes immunoenzymatiques peuvent également être utilisées.

35 L'activité des peptides contenant le site réactif du C1-INH est déterminée en dosant leur pouvoir de fixer

un des substrats naturels du C1-INH, par exemple le C1s.
Dans le cas où l'activité des peptides C1-INH produits
dans la bactérie E. coli se révélait trop faible, on
mettrait en oeuvre l'expression de la protéine C1-INH
5 dans des cellules eucaryotes (de levures ou de mammifères), comme déjà indiqué précédemment, afin d'assurer les modifications post-traductionnelles de cette protéine.

10 EXEMPLE 3 - UTILISATION DU C1-INH OBTENU SELON L'INVENTION
POUR LE DOSAGE DANS LE SERUM DU C1-INH NATUREL

Le C1-inhibiteur obtenu selon l'invention est utilisé comme antigène afin d'immuniser des animaux en vue d'obtenir des anticorps polyclonaux ou monoclonaux (préparation d'hybridomes selon la technique de Köhler et 15 Milstein, Nature 1975). Ces anticorps permettent le dosage du C1-inhibiteur naturel.

15 EXEMPLE 4 - COFFRET DE DIAGNOSTIC
Un mode de réalisation d'un coffret de diagnostic conforme à l'invention peut contenir :
20 - une gamme standard de C1-inhibiteur,
- solution tampon (borate par exemple),
- des anticorps monoclonaux de souris ou polyclonaux de lapin anti-C1-inhibiteur,
- des anticorps anti-C1-inhibiteur marqués par marqueurs 25 enzymatiques ou fluorescents ou radioactifs, par exemple,
- le (ou les) substrats nécessaires à la révélation du marqueur par exemple de l'activité enzymatique dans le cas d'un ELISA.

30 EXEMPLE 5 - UTILISATION DU C1-INHIBITEUR POUR LE TRAITEMENT
DES MALADES

Le C1-inhibiteur ou un fragment de celui-ci porteur de l'activité peut être administré aux malades comme médicament. Une solution de C1-inhibiteur ou un fragment de celui-ci est préparé dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Le traitement peut se faire par 35

voie intraveineuse ou par inhalation avec un aérosol contenant une suspension du produit actif. La dose active est déterminée au cas par cas.

EXEMPLE 6 - DIAGNOSTIC A L'AIDE DE SONDES D'ADN OU D'ARN

5 La sonde conforme à la présente invention qui est représentée à la Figure 1 et les sondes obtenues contenant cette séquence ou une partie de celle-ci peuvent être utilisées pour détecter les variations structurales des gènes, ou des messagers codant pour des formes déféc-
10 tueuses dudit inhibiteur.

Les techniques mises en oeuvres sont :

- prélèvement des cellules des sujets à risque,
- extraction de l'ADN génomique,
- coupure de cet ADN par des enzymes de restriction appropriés,
- séparation des fragments d'ADN obtenus par électrophorèse et transfert de ces fragments sur une membrane et hybridation avec la sonde ADN ou ARN marquée par un marqueur radioactif ou enzymatique par exemple,
- révélation des produits d'hybridation par autoradiographie en cas d'utilisation d'une sonde radioactive.

15 Cette technique est connue sous le nom de technique de Southern (Southern blotting).

20 L'analyse des résultats par rapport à des témoins normaux et à des témoins malades, de préférence appartenant à la même famille que le sujet testé, permet d'identifier
25 les porteurs de cette maladie génétique.

REVENDICATIONS

- 1) ADN recombinant, caractérisé en ce qu'il code pour au moins une partie de l'inhibiteur C1-INH ou d'une protéine très voisine de ce dernier par sa structure primaire ou son activité biologique.
- 2) ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il code pour au moins une partie de l'inhibiteur C1-INH humain ou d'une protéine très voisine de ce dernier par sa structure primaire ou son activité biologique.
- 3) ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un plasmide dénommé pHC1-INH/1, déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur en date du 25 Juin 1986 sous le N° I-573.
- 4) ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente une séquence de nucléotides de son ADNc inséré, qui code pour la phase de lecture ouverte de 288 codons qui répond à la formule ci-après :

20

F T S C G V T B V B Q I P H S P D L A I S T T V R A S T R T L S S S P I L S
 CCTTCAGGACCAAAAGCTGTCACCTCAGTCTCTTCAGATCTGCACCCGGACCTCGCCATAAGCCACACTCTTCAGATCTGCCATCTCGACCCCTGACAGCACCTGCGACACTGCTGAC
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

 H P S D A B L E L I T T U A K A T H T E I S R L L D S L Y T S D T S L V L L H A
 CAACACACTAAGCCGACTTCGCTCATGAGACTCTTGCCCAAGAACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGAC
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

 I T L S A R M E T T D P R E T R F P F R F R E V V I K E V P H N H E E K T P V
 TATCTACCTGACTTCCAACTGAAAGACAACTATTCATCCAAACAAAACACATGACCTTTTCACTGAAACTAACTATTAAGACTGCCCATGTCATACAGAACACTCTGCT
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

 A B F I D Q T L K A E V G C Q B Q L S H P L S L V I L V P Q A L E N R L E D H N E Q
 GCCCCATTCATCATCACCAAACTTTCGAACCCAGCTGCCCTGGCTGACCTCTTCGACAACTCTGACTTCGCTGATCTCGCTGATCCACACCTGCAACATCTGCAACACATGCA
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

 A L S P S V T E A I N H E E L E P B E F C P T I L L T P R I I V T T S C D H N E S I
 GCTTTCACCCCTCTCTCTCTGAAAGCCGATCATGGAGAACTGCGATGTCAGATTCAGCTTCAACTACCCGGATGAAACTGACGACGACTGGAGATATGCTCTGAA
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

 H L E L E F F D F S T D I H L E C C L T E D P D L Q V T S A N G E B O T V L E L T E T
 CATGACAAATGCAATCTTCGATTTCTTCATGACCTTAACCTGCTTCGCTGATGACAGACCCGAGATCTTCAGCTTCTCCGATCACCCACACACTCTGCAACTGACACAC
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

 C V E A A A A A S A I S V A R T T L L T I S V C O P P F L F V V L V D Q Q R E F P V P V
 TCCCCTGACCCCTGCTCACCTGCTGGCATCTCTTCGCGGACCGTCTCTTCAGCTTCACTGAGCTTCTGCTGCTGCTGCTGACCCAGACACACTCTGCAACTGACACAC
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

 C A V T D P R A
 GCCCCGACTATATCACCCGACCCG
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

5) Séquence d'acides aminés déduite du plasmide pHC1-INH/1 selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule ci-après :

5 FTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTL YSSSPRVL SHNSDANL EI INTWVAKNTNN

K1SRLLDLPSDTRLVLLNAYIYL SAKWKTTFDPKKTRM EPFHFKN SVIKVPM MNSKKY PV

10 AHFIDQTLKAKVGQL QLSHNL SLVIL VPQNL KHPL EDMEQALSPSVFKAI M[KLEM SKFQ

PTLLTIPR]KVTTSQDM SIMEKLEFFDFSYDLNL CGLTEDPDLQVSAMQHQT VLELTET

GVEAAAASAISVARTLLVFEVQOPFLFVLWDOOKFPVFMGRVYDPRA

15 6) Séquence d'acides aminés contenant le site réactif du C1-INH, qui s'identifie avec la formule ci-après :

SIMEKLEFFDFSYDLNL CGLTEDPDLQVSAMQHQT VLELTET

GVEAAAASAISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDOOKFPVFMGRVYDPRA

20 7) Sonde pour le diagnostic précoce ou prénatal, au niveau de l'ADN génomique humain, du déficit qui cause la maladie angioedème héréditaire et qui s'identifie avec l'insertion du plasmide pHC1-INH/1 qui répond à la formule selon la revendication 3 ou avec une partie de la même insertion.

25 8) Procédé de préparation d'un clone d'ADN recombinant constitué par la séquence visée à la revendication 4.

9) Procédé de préparation de l'ADN recombinant codant pour le C1-INH humain ou animal ou une protéine voisine de celui-ci, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - une première étape qui consiste à extraire l'ARN total de fragments de foie - une deuxième étape qui consiste à isoler l'ARN polyadénylé, par chromatographie sur du Poly(U)-Sephadex, suivie d'élution à 42°C par du formamide à 50%; - une troisième étape qui consiste à dénaturer l'ARN polyadénylé, par de l'hydroxyde de méthylmercure et à le fractionner par sémentation par un gradient isocinétique de saccharose de 10 à 33% poids/volu-

me; - une quatrième étape qui consiste à identifier les fractions d'ARN qui sont enrichies en messagers codant pour le C1-INH; - une cinquième étape qui consiste à synthétiser de l'ADNc double-brin à partir d'une fraction d'ARN enrichie en ARN messagers codant pour le C1-INH, en rendant une extrémité de l'ADNc homopolymère et en l'intégrant dans le vecteur pUC9 à extrémité poly(dG), puis en introduisant les plasmides recombinants formés, dans des bactéries E. coli compétentes;

10 - une sixième étape qui consiste à cibler les bactéries qui possèdent l'information génétique nécessaire à la production du C1-INH et à isoler les clones d'ADNc qui codent pour le C1-INH.

10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le criblage des clones recombinants est réalisé à 15 l'aide d'un mélange marqué de huit icosamères synthétiques couvrant les amino-acides LVFEVQQ, qui sont une partie du peptide séquencé et positionné au site réactif du C1-inhibiteur humain, à proximité de l'extrémité carboxyle de la protéine, lesquels icosamères synthétiques sont constitués 20 par des oligonucléotides de formule A ci-après :

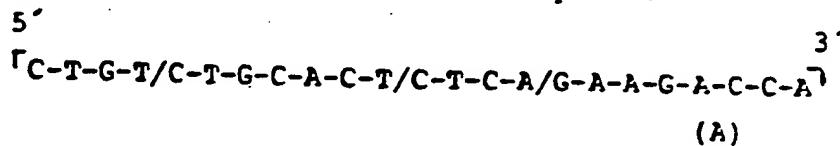


FIG. 1

r T T K G V T S V S Q I P N S P D L A I R D T F V N A S R T L Y S S P R V L S
 CTCACCAACCCAGCTTCACTGACTCTCACATTTCCACACTCCCATAAGCCACACTCCCCTCTACACCACCCAGACTCTAAC
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

 N W S D A N L E L I N T W V A K N T N N R I S R L L D S L P S D F R L V L L N
 CAACAACTGACCCAACTGGACCTCATCAACCTCCCTCCAGAACACCAACAAAGATAGCCCTCTAGACACTCTCCATACCCCTCTAAC
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

 I Y L S A K W K T T P D P K K T R M E P P K N S V I K V P M H N S R K Y P V
 TATCTACCTACTCCAACTGGACACAACTTCAATTCTTCACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCA
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380

 P S / I

 A W F I D Q T L R A K V C Q L Q S N W L S L V P Q K L R N R L F I N L C
 UCCCCATTCAATTGACCAAACCTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCAAACTTCA
 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

 A L S P S V F I A I H E K L E H S K F Q P T L L T P R I K V T I S Q D H L S I
 CCCTCTCAGCCCT
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

 I, L E F F D F S V D L N L C C L T E D P D L Q V S A H Q T V L E L T E T
 CATGCCAAATTGCAATTCTCCATTCT
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

 P S / I

 C V E A A A S A I S V A R T L L V P E V Q Q P F L F V L W D Q Q H N F P V P
 TCCCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCC
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

 P S / I

 C A V Y D P R A
 CCCCCGACTATAATCCCCAACCCGCGCGACCTCACCATCACCTTAGGGCAGCCCTACCTCTCCACCTCTCCCTGACTCTCCCTGACTCT
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

 CACCTCTCCCTCACCTCCCTATCCACAAAACCCCTCCCTGAGCTCTCCACCTCTCCACCTCTCCCTGACTCTCCCTGACTCTCCCTGACT
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

 CCTTCTC

2601034

1 / 5

2601034

215

P T R C V T S V S Q I F H S P D L A I R D T F V N A S R T L T S S P R V L S
CTCACCAAGGTCACCTACTCTCATCTCCAGGCCAGACCTCCCATTACCCACACCTTCTCATCCACCCAGCTCTACGACCACCCAGAGCTCTAG
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

N N S R A N L E L I N I W V A K N T H N K I S R L D S L P S D T R L V L L N A
CAACAAACGTCACCCAACTTGAACTCATACACCTGGCCAGAACACCAAGAACACATAGCCCTCTTCACTCAGACTCTCCCTCCATACCTCAATTC
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

I Y L S A K W K T T P D P K K T R H F P F H F K W S V I K V P H N H S K K T P V
TATCTACCTGACTGCTGAAGTCCAAACAACTTATCCAGAAACAGGAAACCTTCACTTCAACCTTAACTTAAAGTAACTCCATACCTCCATACCTCCTG
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

A H P I D Q T L R A K V C Q L Q L S H N L S L V I L V P Q N L K H R L E D H E Q
GGCCCATTTATGACCAAACCTGAAACCCAGCTGGCCACCTCCACCTCTCCACACTCTCCATACCTCTCCATACCTCTCCATACCTCTCCATACCTC
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

A L S P V F K A I H E K L E H S R F Q P T L L T L P R I R V T F S Q D H L S I
CCCTCTAGCCCTCTCTCTTCAAGCCATCATCTGACAACTCGATCTCCAGATCTCCAGCTTCAACTCTCTTAACACTCCCTCAAGCTTCACTCTCCAT
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

H E K L E P F D F S Y D L R K L C G L T D P D L Q V S A H Q H Q T V L E L T E T
CATGCCACAAATTGCAATTCTTCGATTTTCTTATGCCTTAACCTCTCCCTGAGGACCCAGATCTTCAGCTTCTCCATACCCAGACACTCTGAACTCACAC
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

C V E A A A A S A I S V A R T L L V F E V Q Q P P L F V L W D Q Q H K P V P R
TCGGGTGCAAGCCCTCACCCCTGGCCATCTCTCCCTCCCTCCCTCCATCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

G R V T D P R A
CCCCGACTATAACCCAGCCCC
850 860

FIG. 2

2601034

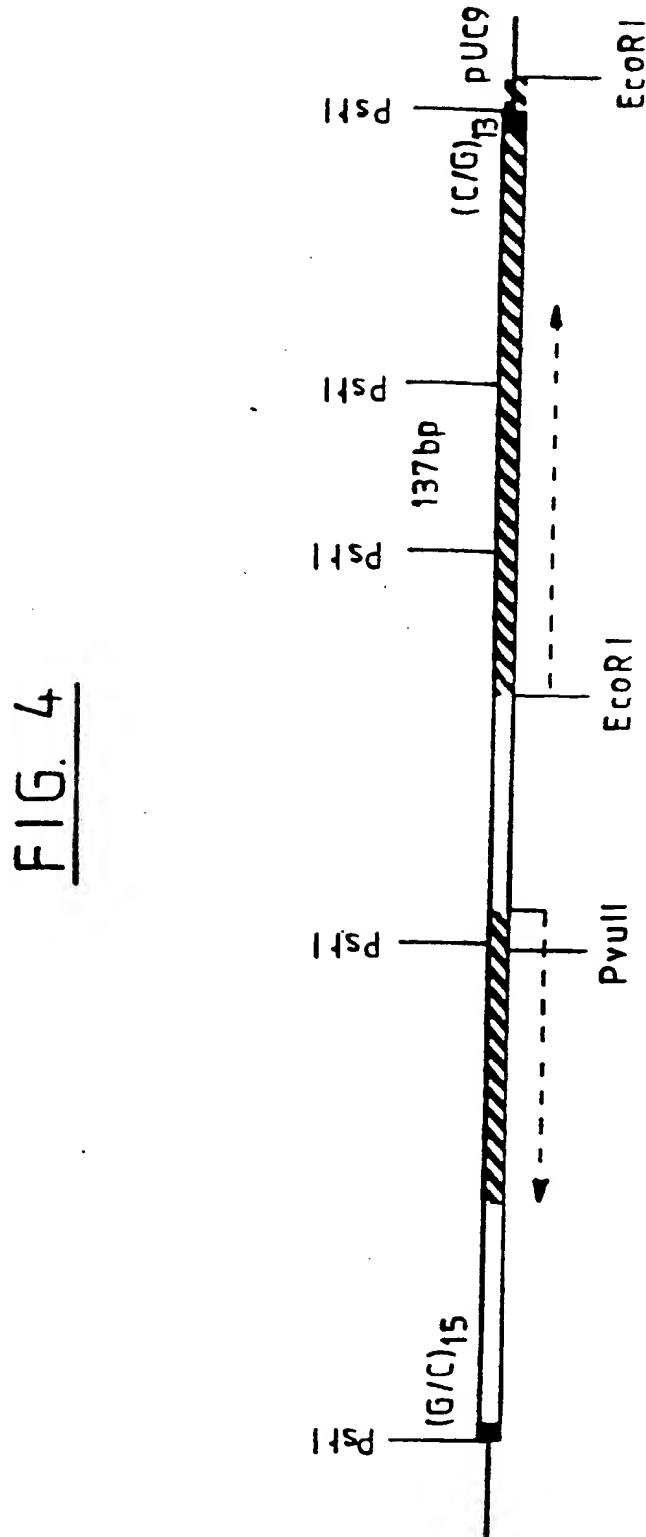
3 / 5

FIG. 3.

F T T K G V T S V S Q I F S P O L A T R D T F V N A S R . Y S S S P R V L S M N S D A M . E L I N T W A K N T N M
K I S R L L D S L P S D T R L V L I M A I Y L S A K H K T T F D P K K T R M E P F H F K M S V I K Y P M M S K K Y P V
A H F I D Q T L K A K Y G Q Q Q L S H M L S L V I L V P Q M L K H R L E D M E Q A L S P S V F K A I M E K L E M S K F Q
P T I L T L P R I K V T T S Q D M L S I M E K L E F F D F S Y D L M L C G L T E O P D L Q V S A M O H Q T V L E L T E T
G V E A A A A S A I S V A R T L L V F E V Q Q P F L F V L W D Q Q H K F P V F M G R V Y D P R A

2601034

4 / 5



2601034

5 / 5

FIG. 5

1 2 3 4 5
TEMOIN ARN TOTAL ARN SPECIFIQUE
SANS HYBRIDANT AVEC
ARN LE PLASMIDE CODANT
POUR LF C1-INH

30-

46-

69-

92-



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)